

細胞の固定化方法

発明の背景

発明の分野

本発明は、基体の表面の所望領域に細胞を固定化する細胞の固定化方法に関する。

関連技術の説明

近年、生命科学分野における研究の急速な発展に伴い、細胞、細胞小器官、タンパク質、核酸、リン脂質等の生体試料の活性、機能、構造に関してミクロ的な解明が要求されている。また、これらの解明に伴い、生体試料の電気素子への適用をはじめとした、各種デバイスへの適用の可能性の検討、DNAチップ、プロテインチップ等のスクリーニング技術への応用の検討が活発に行われている。各種デバイスとしては、バイオセンサー、スイッチング素子、バイオリアクター、ハイブリッド型人工臓器、ニューロコンピュータ、DNAコンピュータなどが挙げられる。

上記、生体試料のミクロ的な解明、これらを素子として用いるデバイス技術またはスクリーニング技術いずれにおいても生体試料をその機能を維持した状態で所望の微小領域に固定化する技術が技術発展・普及の端緒となりうる。

例えば、本出願人は、細胞または組織に障害を与えることなく、細胞の電気生理的活動の観察を安定かつ長期間行うことを可能とした電極を備えた細胞外電位測定装置に関し出願を行った（特開平6-78889号公報、特開平6-296595号公報参照）。

神経細胞などが活動する際には、神経細胞のイオン透過性に変化が生じ、これに伴って細胞膜内外のイオン濃度が変化する。上記細胞外電位測定装置においては、電極上に

細胞を固定化して、神経細胞近傍のイオン濃度の変化に伴う電極の電位変化を測定することによって、神経細胞の活動を観察することを可能とする。したがって、上記細胞外電位測定装置においても、電極表面のみに細胞を固定化する技術が所望されている。電極表面のみに確実に細胞を固定化することにより、各細胞の電気生理的活動を検出でき、さらには、細胞間の相互作用を複数の細胞の電気生理的計測結果から検出することが可能となる。

生体試料をその機能を維持した状態で基板上の所望の領域に固定化することは非常に難しく、しかも所望の領域が微小である場合にはさらなる困難を伴うものである。特に、細胞を、その活性を検出する用途、その活性を利用する用途に用いる場合、生きたまま固定化することが必要であり、他の化学物質の固定化方法を適用することができず困難であった。

従来より、細胞を活性を保持した状態で所望の領域に固定化する方法として、細胞を接着させようとする領域には、細胞接着性高分子を存在させ、そうでない領域には細胞非接着性高分子を存在させることにより細胞を所望の領域に固定化させる方法が知られている（特公平7-51061号公報参照）。また、金属穴空きマスクを基板上に置き、物理的に細胞を定着する領域を限定する方法が知られている（Yasuhiko Jimbo *et al.* Simultaneous Measurement of Intracellular Calcium and Electrical Activity from Patterned Neural Networks in Culture. *IEEE Transaction on Biomedical Engineering* Vol.40, No.8 PP.804-810, 1993. 参照）。また、帯電ドラムを用いて、静電作用により細胞をパターンニングする方法が知られている（特公平2-245181号公報参照）。

しかしながら、細胞接着性高分子と細胞非接着性高分子を用いることにより所望の領域に細胞を固定化する方法のような表面改質に伴う細胞の配列のパターンニングは、境界

領域が不鮮明で、そのため、微小な領域を選択して細胞を接着させることが困難である。

また、金属穴あきマスクを用いた方法においては、手作業でなされるマスクの除去の際に細胞を剥がしてしまうなどの問題があり、十分な方法とはいえない。さらに、帯電ドラムを用いた方法においては、ドラム形状に合う基板のみしか用いることができず、また装置も大掛かりになってしまうという欠点を有する。

上記のように、従来の技術はいずれも、高精度で所望の微小領域に細胞を固定化する方法としては十分でなかった。

発明の簡単な要旨

本発明は、かかる現状に鑑みてなされたものであり、微小領域であったり、複雑なパターンを構成する領域であっても、高精度に、活性を保持した状態で細胞を固定化できる固定化方法を提供することを目的とする。

上記目的を達成するために、本発明は、細胞を基体の表面の内、所望領域に固定化する細胞の固定化方法であって、前記基体の表面の前記所望領域を除く領域にマスク層を形成する工程（a）、工程（a）の後、前記基体の表面と前記マスク層の表面に前記細胞を含む溶液を接触させ、前記細胞を固定化する工程（b）、および工程（b）の後、前記細胞が活性を失うことなく、かつ前記マスク層が前記基体から分離するような条件に前記溶液のpHを調整する工程（c）、を包含する。

上記固定化方法においては、工程（c）において、前記マスク層が前記基体から分離する。このとき、前記マスク層の表面に固定化されていた細胞も前記マスク層とともに前記基体から分離される。したがって、前記基体の表面の所望領域に固定化された細胞のみが、固定化された状態を維持することになる。このとき、細胞は活性を保持した状

態、すなわち生きた状態で、固定化されている。前記溶液としては、例えば培養液、生理食塩水を用いることができるが、好ましくは、培養液を用いる。培養液を用いた場合、細胞の固定化とともに細胞を増殖することができるからである。

例えば、工程（a）が、前記基体の表面に前記マスク層を形成する工程と、前記所望領域の前記マスク層を除去する工程を含む。この場合、前記マスク層は感光性を有するマスク材料で形成され、前記マスク層を除去する工程が、前記所望領域又は前記所望領域を除く領域のいずれかの前記マスク層を露光した後、現像する工程であることが望ましい。このような工程でマスク層を形成する場合、複雑なパターンや、微小領域であっても、マスク層を高精細に形成することができる。

感光性を有するマスク材料を用いる場合、例えば工程（c）において、前記溶液のpHを工程（b）における前記溶液のpHより大きくすることにより、工程（c）で前記マスク層が基体から分離されるようなマスク材料を用いることができる。または、例えば工程（c）において、前記pHを7.9以上8.1以下とすることにより、工程（c）で前記マスク層が基体から分離されるようなマスク材料を用いることができる。

工程（c）において、例えば、前記溶液の周囲の雰囲気中の二酸化炭素濃度を調整することにより、前記溶液のpHを調整することができる。または、工程（c）において、前記溶液にpH調整剤を添加することにより、前記培養液のpHを調整することができる。

工程（a）の後であり、かつ、工程（b）の前に、前記マスク層を加熱する工程を有することが好ましく、この場合、前記加熱は、前記マスク層中の前記細胞に対する有害な成分の沸点以上の温度にする。このような処理を施すことにより、マスク層に含まれる細胞に有害な成分を気化させることができる。すなわち、マスク層中の有害な成分に

より細胞が活性を失ってしまうことを防ぐことができる。

工程（b）において、好ましくは、前記細胞を固定化材料を介して固定化する。前記基体の表面が、細胞が固定化されにくい材料からなる場合であっても、細胞の固定化を容易及び／又は強固にすることができるからである。前記固定化材料としては、例えば細胞接着性タンパク質、正帯電性高分子、または強塩基性官能基を有する高分子を含む材料を用いることができる。

本発明の上記目的、他の目的、特徴、及び利点は、添付図面参照の下、以下の好適な実施形態の詳細な説明から明らかにされる。

図面の簡単な説明

図１は、第１の実施形態の細胞の固定化方法を示すフローチャートである。

図２は、本発明の細胞の固定化方法を模式的に示す図である。

図３は、第２の実施形態の一体型複合電極の構成を模式的に示す断面図である。

図４は、第２の実施形態の一体型複合電極の構成を模式的に示す図３のＡ－Ａ矢視断面図である。

図５は、第２の実施形態の細胞外電位測定装置の概略図である。

図６は、第３の実施形態の細胞固定化器のセンサ部の上面図である。

図７は、第４の実施形態の細胞固定化器の構成を模式的に示す断面図である。

図８は、第４の実施形態の細胞固定化器の構成を模式的に示す図７のＢ－Ｂ矢視断面図である。

図９は、第５の実施形態の細胞固定化器のセンサ部の上面図である。

図１０は、実施例１における測定結果を示す図である。

図１１は、実施例２における測定結果を示す図である。

発明の詳細な説明

以下、本発明をより詳細に説明する。

(第 1 の実施形態)

図 1、図 2 を用いて第 1 の実施形態の細胞の固定化方法を説明する。本実施形態においては、細胞を固定化する基体として基板を用いる。図 1 は、本実施形態の細胞の固定化方法を示すフローチャートである。図 2 は、本実施形態の細胞の固定化方法を模式的に示す図である。

本実施形態の固定化方法は、まず、基板 1 の表面 1 0 3 にマスク材料を塗布してマスク層 1 2 を形成する (S t 1)。次に、基板 1 の表面 1 0 3 の領域 1 0 0 に対応するマスク層 1 2 を除去する (S t 2)。このようにして、基板 1 の表面 1 0 3 の所望の領域 1 0 0 を除く領域 1 0 1 にマスク層 1 2 を形成する。マスク材料としては、好適には感光性材料を用いることができる。ポジティブ型の感光性材料を用いる場合は、S t 2 において、領域 1 0 0 に対応するマスク層 1 2 のみを露光し、一方、ネガティブ型の感光性材料を用いる場合は、領域 1 0 1 に対応するマスク層 1 2 のみを露光する。露光後、現像することにより、領域 1 0 0 に対応するマスク層 1 2 のみを除去することができる。かかる工程における露光及び現像は、通常の方法に従って行うことができる。なお、マスク層 1 2 を形成する材料、後述する S t 6 に示す処理によりマスク層 1 2 が基板 1 より分離されるものを使用する。

マスク材料に、細胞に有害な成分が含まれている場合は、マスク層 1 2 形成の後、かかる有害成分を除去する処理を行う。例えば、有害な成分が加熱により気化する場合、マスク層 1 2 を有害な成分の沸点より高い温度まで加熱し、有害な成分を気化させるこ

とにより除去する (S t 3)。

次に、溶液保持部 1 7 を構成した後、溶液保持部 1 7 の底面を固定化材料で被覆し、溶液保持部 1 7 内に培養液 5 を注入する (S t 4)。溶液保持部 1 7 は、基板 1 の表面 1 0 3 と、マスク層 1 2 の表面 1 2 1 を含む固定化媒体最表面 1 0 3, 1 2 1 を底面とする領域内に溶液を保持し得るように隔壁部材 4 を設置することにより構成する。

そして、培養液 5 内に細胞 6 を播種し、細胞 6 を固定化媒体最表面 1 0 3, 1 2 1 に固定化する (S t 5)。培養液 5 内に細胞 6 を播種すると、付着性細胞が、固定化媒体最表面 1 0 3, 1 2 1 に自然に固定される。

本明細書でいう固定化材料とは、細胞 6 の固定化を容易及び／又は強固とする材料をいう。固定化材料は固定化対象となる細胞 6 の種類に応じて任意に選択できる。例えば、固定化材料として、細胞接着性のタンパク質であるコラーゲン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン等のマトリクス材料が好適に用いられる。または、ポリエチレンイミン (P E I)、ポリオルニチン (P O)、ポリリジン (P L) 等の正荷電性高分子、あるいはこれらの材料の組み合わせた材料が好適に用いられる。または、ビグアニド基、もしくはカルバモイルグアニジド基等の強塩基性官能基を持つ高分子が好適に用いられる。具体的にはアシルビグアニド-*c o*-アシルアミン (P A B)、アシル-N-カルバモイルグアニジド-*c o*-アシルアミン (P A C) がこれに該当する。

細胞は、通常その細胞膜が、負に帯電しているので、正荷電性高分子、強塩基性官能基を持つ高分子との間に静電相互作用が働き、細胞 6 の固定化媒体最表面 1 0 3, 1 2 1 への固定化を容易及び／又は強固することができる。なお、本明細書でいう正荷電性高分子とは、その高分子の $p K a$ 以下の $p H$ で正に帯電する高分子をいう。

細胞 6 を固定化した後、領域 1 0 1 に対応するマスク層 1 2 を基板 1 から分離する (S

t 6)。分離方法は、培養液 5 の pH を調整し、所定時間放置する。培養液 5 の pH は、所定時間放置の後、マスク層 1 2 が基板 1 から分離される pH とする。前記 pH は、マスク層 1 2 と基板 1 との接着強度（マスク層 1 2 の材料、基板 1 の材料、処理温度等を含む形成条件による）により異なるので、形成条件に応じた pH を選択する。なお、前記 pH は、細胞 6 が活性を失わない条件とする。一方、S t 5 における培養液 5 の pH は、マスク層 1 2 が分離しない条件とする。例えば、S t 5 において、培養液 5 の pH は、略中性（6.8 以上 7.8 以下）であり、S t 6 において、培養液 5 の pH は、7.9 以上 8.1 以下であり得る。

S t 6 における、培養液 5 の pH は、培養液 5 の周囲の雰囲気中の二酸化炭素濃度を調整することにより調整したり、培養液 5 に pH 調整剤を添加することにより調整したりすることができる。なお、S t 6 においては、S t 5 の培養液 5 をそのまま用いているが、例えば S t 5 の培養液 5 を細胞 6 が生存可能な他の溶液に交換し、前記溶液の pH に応じて前記マスク層 1 2 を分離させるようにしてもよい。このような溶液として、他の培養液や、生理食塩水を使用し得る。

S t 6 においては、基板 1 の表面 1 0 3 の所望の領域 1 0 0 外に固定化された細胞 6 が、マスク層 1 2 とともに基板 1 上から分離されることになる。以上の方法により、基板 1 上の所望の領域 1 0 0 のみに細胞 6 を固定化することが可能となる。なお、マスク層 1 2 が基板 1 から分離された後は、分離されたマスク層 1 2 を培養液 5 中から取り除く。

マスク層 1 2 を形成するマスク材料には、好ましくは、感光性材料を使用する。より好ましくは、アルカリ溶液に浸漬することにより基体から分離され、加熱により細胞に有害な成分を除去され得る材料を使用する。例えば、ポリイミド樹脂を含有する感光性

材料を用いることができ、このような材料として、CRC-8300（商品名 住友化学社製）、RN-901（商品名 日産化学社製）等が挙げられる。

尚、マスク材料として感光性材料を用いることにより、マスク層12の形成工程においてフォトリソグラフィによるパターン形成を利用することができ、微小かつ複雑な領域に細胞6を固定化することが可能となる。

基板1としては、固定化した細胞6の用途等に応じて任意のものを用いることができる。例えば、固定化した細胞6を電気生理的計測の対象として用いる場合には、電極及び配線が形成された基板を使用し（第2～5の実施形態で示す）、固定化した細胞を顕微鏡の観察対象とする場合には、透明な基板を使用するとよい。

培養液5としては、固定化対象の細胞6の種類に応じて任意の培養液を選択し得る。例えば、イーグル基本培地（BME）、最小必須培地（EMEM）、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、ジョクリック改変培地（j o k l i k）、199培地（199）、RPMI-1640（1640）、ハムF-10培地（F-10）、ハムF-12培地（F-12）、ハムF12K培地（F-12K）、レイボビッツL-15培地（L-15）、マッコイ5A培地（M c C o y 5 A）、NCTC135培地（135）、ウィリアムズE培地（W i l l i a m）、ウェイマウスMB752/1培地（W a y m o u t h）、CMRL-1066（1066）またはイスコフ改変ダルベッコ改変イーグル培地（I s c o v e）等を使用し得る。また、上記培地に、種々の栄養素、成長因子、抗生物質などをさらに添加して、培養液5として使用し得る。なお、St5において、細胞6の固定化が完了するまでは、マスク層12を基板1から分離させる作用を有さない培養液5を選択する。

（第2の実施形態）

本実施形態は、細胞固定化器の電極上に細胞を固定化する固定化方法に係るものである。上記細胞固定化器は、細胞の電気生理的变化に起因する電気信号の検出に用いられる細胞外電位測定装置の構成要素の一つである。以下、本実施形態で用いられる細胞固定化器を備えた細胞外電位測定装置の構成を説明する。

[細胞固定化器の構成]

図3は、本実施形態の細胞外電位測定装置の一部分を構成する細胞固定化器19の構成を模式的に示す断面図である。図4は、図3のA-A矢視断面図である。ただし、図3は細胞固定化器19に細胞61が固定化されている状態（すなわち、図2のSt5の状態）を示し、図4は細胞61が固定化される前の状態（すなわち、図2のSt4の状態）を示す。また、図4においては、センサ部16の裏面に形成されているリード線9aを点線で示す。

細胞固定化器19は、電極11を備えたセンサ部16及び溶液保持部171とからなる。センサ部16は、電極11及びこれに接続するリード線9aを備えた基板1aからなる。リード線9aは外部接続部10を除いてその上面が絶縁層3で被覆されている。リード線9aの外部接続部10の上面は、被覆層21で被覆されている。被覆層21は、外部接続部10が曝される周囲の雰囲気に応じて、かかる雰囲気に対して耐性の強い導電性材料を選択するようにする。外部接続部10は、被覆層21で被覆されていることより、その耐久性が向上するが、必ずしも被覆層21により被覆されていなくてもよい。

電極11の上面形状は、好ましくは、円形もしくは正方形であって、例えば、直径もしくは一辺の長さが略 $1\mu\text{m}$ ～ $2000\mu\text{m}$ の範囲であり得る。電極の大きさが測定対象の細胞より大きい場合、一つの電極で複数の細胞の電気生理的活動に由来する電気信号を検出することができる。

細胞固定化器 1 9 は、センサ部 1 6 上に細胞培養のための溶液保持部 1 7 1 を備える。溶液保持部 1 7 1 は、センサ部 1 6 上に設置された円筒状の隔壁部材 4 1、隔壁部材 4 1 の内部領域、及び当該内部領域に設置された参照電極 1 3 からなる。隔壁部材 4 1 は、後述する細胞の固定化工程の一工程である所望パターンにマスク層 1 2 a を形成する形成工程の後に設置する。

参照電極 1 3 は、測定時に、細胞培養液 5 1 に浸漬されていればよく、予め溶液保持部 1 7 1 内に固定されている構成であってもよいし、測定時に培養液 5 1 内に投入され固定される構成であってもよい。例えば、図示しないが、参照電極 1 3 は、隔壁部材 4 1 の内壁に取り付けられている構成であってもよい。

基板 1 a としては、好ましくは、単結晶シリコン、アモルファスシリコン、炭化ケイ素、酸化ケイ素、窒化ケイ素などに代表される半導体材料、シリコン・オン・インシュレータ（SOI）などに代表されるこれら半導体材料の複合材料、ガラス、石英ガラス、アルミナ、サファイア、フォスフェライト、炭化ケイ素、酸化ケイ素、および窒化ケイ素からなる群から選択される無機絶縁材料、ポリエチレン、エチレン、ポリプロピレン、ポリイソブチレン、ポリエチレンテレフタレート（PET）、不飽和ポリエステル、含フッ素樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセタール、アクリル樹脂、ポリアクリロニトリル、ポリスチレン、アセタール樹脂、ポリカーボネート（PC）、ポリアミド、フェノール樹脂、ユリア樹脂、エポキシ樹脂、メラミン樹脂、スチレン・アクリロニトリル共重合体、アクリロニトリル・ブタジエンスチレン共重合体、シリコン樹脂、ポリフェニレンオキサイドおよびポリスルホンからなる群から選択される有機材料により形成された基板を使用する。さらに好ましくは、単結晶シリコン、SOI、PET、またはPCにより形成された基板を

使用する。

電極 1 1 を形成する電極材料としては、好ましくは、白金黒、白金、金、パラジウム、ロジウム、銀、およびタングステンからなる群から選択される金属材料、酸化チタン、酸化スズ、酸化マンガン、酸化鉛、およびインジウム錫酸化物（ITO）からなる群から選択される金属酸化物材料が使用される。これらの材料から選択された 1 種類の材料を使用して電極 1 1 を形成してもよいし、複数種類の材料を、例えば層状に堆積させて電極 1 1 を形成してもよい。電極 1 1 上面は、さらに導電性高分子、または単分子膜によって被覆されていてもよい。電極 1 1 に接続するリード線 9 a を形成するリード線材料にも、上記電極材料と同様の材料を好適に使用することができる。

電極 1 1 からの電気信号は、参照電極 1 3 の電位を基準として測定される。通常、参照電極 1 3 は、その表面積が電極 1 1 の表面積以上であり、好ましくは電極 1 1 の表面積より大きく、好ましくは、金、白金、銀—塩化銀などの材料からなるものとするが、任意の大きさ及び形状であり得る。

隔壁部材 4 1 は、例えばアクリルにより作製し得る。隔壁部材 4 1 は、電極 1 1 上面を含むセンサ部 1 6 の上面を底面とする内部領域に細胞培養液 5 1 を保持できる構成であれば良く、その形状は円筒状に限定されることはない。

[細胞固定化器の作製方法]

細胞固定化器 1 9 の作製方法の一例を示す。まず、電極材料を基板 1 a 上に蒸着した後、フォトリジストを用いてエッチングすることにより、電極 1 1、および対応するリード線 9 a を 1 セットとしてかかるセットを複数セット有する所望のパターンを形成する。その後、外部接続部 1 0 を除くリード線 9 a の上面を絶縁層 3 で被覆する。さらに、リード線 9 a の外部接続部 1 0 の上面を被覆層 2 1 で被覆する。その後、基板 1 a を所

定角の小片に切り出し、一つの小片をセンサ部 1 6 とする。一つの小片には、電極 1 1 及びリード線 9 a が 1 セット形成されているようにする。電極 1 1 のパターンは、予め前記パターンを形成させたステンシルマスクを通じて蒸着するマスク法や、リフトオフ法によって形成してもよい。

[細胞の固定化方法]

上記センサ部 1 6 の電極 1 1 上に、本発明の方法を用いて細胞を固定化する方法について説明する。まずセンサ部 1 6 の最表面のうち、電極 1 1 を除き少なくともその周囲を包含する領域にマスク層 1 2 a を形成する。このとき、マスク層 1 2 a は、後の工程で隔壁部材 4 1 を設けることとなる領域にはかからないように形成する。

マスク層 1 2 a を形成するために、好適に用いられるマスク材料は、第 1 の実施形態と同様である。なお、マスク材料は、絶縁層 3 とは異なる材料であり、かつその分離条件下において絶縁層 3 が除去されないような材料を用いるようにする。

マスク層 1 2 a に、感光性材料を用いることにより、フォトエッチングによるパターン形成を利用して、電極 1 1 上面を除く領域にマスク層 1 2 a を形成することができる。センサ部 1 6 上面の電極 1 1 を含む広範な領域にマスク層 1 2 a を形成した後、フォトエッチングによりセンサ部 1 6 上の電極 1 1 部分のマスク層 1 2 a を除去し、該電極 1 1 上面を露出させることが可能となる。

マスク層 1 2 a 形成工程の後、上述したように、隔壁部材 4 1 を電極 1 1 を囲むようにセンサ部 1 6 上に設置し、溶液保持部 1 7 1 を構成する。

その後、センサ部 1 6 の最上面のうち、溶液保持部 1 7 1 内の領域に固定化材料を塗布する。固定化材料は、細胞の細胞膜を変性させることがない材料を用いる。したがって、固定化材料と細胞膜との間で、架橋反応が生じることにより、細胞を固定化するよ

うな材料は使用しない。生体内での状態に近い状態の細胞の電気生理的变化に由来する電気信号を検出するためである。第1の実施形態に示した固定化材料が、好適に使用される。

固定化材料の固定化は、固定化材料を所定の濃度で溶解させた溶液を電極11上に曝し、所定時間経過の後、電極11の上面から取り除き、電極上面を少なくとも1回以上洗浄し、乾燥することにより行う。固定化材料を溶解させた溶液を電極11の上面にスポットすることにより、電極11上に固定化材料を固定してもよい。なお、固定化材料として、細胞接着性のタンパク質等のマトリクス材料を用いる場合は、公知の方法によりマトリクス材料を電極11の上面に塗布する。

次に、溶液保持部171内に培養液51を満たす。第1の実施形態に示した培養液が好適に使用される。

その後、培養液51内に、所望の細胞61を播種する。細胞61の培養が進行すると同時に、付着性細胞が、固定化材料を介して、センサ部16の最上面に固定化される。細胞の固定化後、培養液51をマスク層12aが剥離する条件とし、しばらく放置することにより、マスク層12aが自発的にセンサ部16上面から分離される。かかる工程により、細胞61が電極11の上面のみに固定される。

細胞61が、電極11の最上面に固定化された状態で細胞61の電気生理的变化に起因する電気信号の測定を開始する。電気信号の測定は、一対の電極11、13から検出される電気信号に基づいて、電極11と参照電極13との間の電位差を測定する。細胞は、そのイオンチャンネルの活性に対応して、細胞膜のイオン透過性が変化し、かかる変化に伴って細胞膜内外のイオン濃度が変化する。すなわち、細胞膜内外のイオン濃度勾配が変化する。かかるイオン濃度勾配の変化をうち消し合うように、電極11と参照

電極 1 3 との間の電位差が変化する。したがって、前記電位差を測定することにより、細胞の電気生理的変化を間接的に検出することができる。前記電位差は、例えば、後述する細胞外電位測定装置により測定することができる。

[細胞外電位測定装置の構成]

図 5 は、本実施形態の細胞外電位測定装置の概略図である。細胞外電位測定装置 4 0 は、制御部 3 9、これに接続された信号増幅部 3 3、刺激信号付与部 3 4 及び溶液駆動部 3 8、撮像部 3 5、並びに載置部 3 6 からなる。

載置部 3 6 には、細胞固定化器 1 9 が載置される。載置部 3 6 は、載置された細胞固定化器 1 9 を所定の温度、ガス濃度、湿度に保つ機能を備える。制御部 3 9 は、信号増幅部 3 3 から入力される信号に基づいて、細胞固定化器 1 9 の電極 1 1, 1 3 間の電位差を検出、記録する。また、制御部 3 9 は、設定された刺激条件に基づいて刺激信号付与部 3 4 を制御する。刺激信号付与部 3 4 は、D/A 変換器を備え、当該変換器、及び回線 3 7 を介して、細胞固定化器 1 9 上の細胞に電氣的刺激を印加する。細胞固定化器 1 9 からの電気信号は回線 3 2 を介して信号増幅装置 3 3 に導出され、ここで増幅され、周波数帯域を制限され、A/D 変換器を介して制御部 3 9 に入力される。

溶液駆動部 3 8 は、細胞固定化器 1 9 の溶液保持部 1 7 内に保持された培養液 5 1 を排出し、あるいは溶液保持部 1 7 1 内に培養液 5 1 を注入する機能を有する。必要に応じて制御部 3 9 により駆動される。撮像部 3 5 を用いて、細胞固定化器 1 9 上の電極 1 1 を撮像もしくは観察することが可能である。また、刺激信号付与部 3 4 は、撮像部 3 5 による撮像データに基づいて、出力する刺激信号を選択する構成であってもよい。

細胞外電位測定装置 4 0 は、刺激信号付与部 3 4 から細胞 6 1 に刺激信号付与し、その応答に対応した細胞 6 の電気生理的変化を検出することもできるし、刺激信号を与え

ることなく、細胞において自発的に生じる電気生理的变化を検出することもできる。

(第3の実施形態)

本実施形態は、第2の実施形態とは異なる構成の細胞固定化器にかかるものである。

図6は、第3の実施形態の細胞固定化器19bのセンサ部16bの上面を示す図である。細胞固定化器19bは、6行6列の格子状の各交点に電極11bが配置されている構成である。第2の実施形態の細胞固定化器19は、センサ部16上に一つの電極11のみが形成されている構成であるが、本実施形態の細胞固定化器19bは、センサ部16b上に複数の電極11bとこれに対応するリード線9bが形成されている構成である。

図6は、溶液保持部を省略して示すが、溶液保持部を構成する隔壁部材（第2の実施形態の隔壁部材41と同様の構成）は、一つの電極11b毎に設置する構成、複数の電極11b毎に設置する構成いずれであってもよい。一つの電極11b毎に隔壁部材を設置する構成は、例えば各電極11b上に固定された細胞の薬品応答性を測定する際に有用であり、複数の電極11b毎に隔壁部材を設置する構成は、例えば各電極11b上に固定化した神経細胞間でネットワークを形成させることができ、ネットワークに関する解析を行う際に有用である。

図6に示すセンサ部16bを用いた場合であっても、上述した細胞の固定化方法を用いることができる。

本実施形態においても、第2の実施形態に示した細胞の固定化方法を用いて細胞を電極11b上のみに固定化することが可能である。

(第4の実施形態)

本実施形態は、第2、3の実施形態とは異なる構成の細胞固定化器にかかるものである。図7は、本実施形態の細胞固定化器19cの構成を模式的に示す断面図である。図

8は図7のB-B矢視断面図である。ただし、図7は細胞固定化器19cに細胞61が固定化されている状態（すなわち、図2のSt5の状態）を示すが、図8は細胞61が固定化される前の状態（すなわち、図2のSt4の状態）を示す。また、図8においては、センサ部16cの下面に形成されているリード線9cを点線で示す。

本実施形態の細胞固定化器19cは、第2の実施形態の細胞固定化器19とは、センサ部の構成が異なるのみなので、センサ部以外の構成は同一の符号を付して説明を省略する。

基板1cは貫通孔14cを有する。貫通孔14cの孔壁面141c、および孔開口部周縁142cには、電極11cが形成されている。電極11cは、真空蒸着法あるいはスパッタ法を用いて電極材料を貫通孔14の孔壁面141cおよび開口部周縁142cに付着させることにより形成する。

センサ部16cの下面には、電極11cに接続するようにリード線9cが形成されている。よって、センサ部16cと隔壁部材41とは必ずしも別構成である必要はなく、一体で形成することも可能である。尚、リード線9cは、センサ部16cの上面に形成されている構成であっても良い。

貫通孔14cは、上面開口部が下面開口部より大きい円錐台形状を有する。貫通孔14cに細胞61の一部が捕捉され、細胞61がセンサ部16c上に密着して保持される。貫通孔14cは、円錐台形状を有することにより、細胞61との広い密着面積を確保することができるが、貫通孔14cの形状は、円錐台形状に限定されることはなく、細胞61の一部を捕捉可能な形状であればよい。貫通孔14cの大きさは、捕捉対象となる細胞61に依存した任意の大きさを採用し得る。例えば、センサ部16c上面での開口部の直径が5 μ m以上100 μ m以下の範囲にあり、下面開口部の直径が1 μ m以上1

0 μm 以下の範囲にあり、好適な例示としては固定化対象の細胞の長径が略30 μm の場合、上面開口部の直径が略20 μm 、下面開口部の直径が略5 μm 、深さが略15 μm である。

貫通孔14cの形成方法は、基板1cの材料によって異なるが、例えば基板1cがPETからなる場合には、エキシマレーザを用いて形成することができる。また、例えば基板1cがSiウェハーである場合には、エッチングにより形成することができる。

さらに、貫通孔14cの下方から細胞61を吸引可能な吸引手段を備える構成とすることができる。このように構成することにより、貫通孔14cにおける細胞61の捕捉をより強固なものとすることができ、浮遊性の細胞であっても貫通孔14cに捕捉することができる。

基板1cを形成する基板材料、電極11cを形成する電極材料、また、細胞の固定化工程でマスク層12cの形成に用いられるマスク材料はいずれも第1の実施形態に示した材料を使用することができる。

本実施形態においても、第2の実施形態に示した細胞の固定化方法を用いて細胞を所望の位置に固定化することが可能である。尚、本発明にかかる固定化方法は、貫通孔14cと同じく、細胞61を電極11c上に固定するのに寄与するとともに、さらに、所望の領域以外の領域に細胞61が固定化されることを防ぐ。

(第5の実施形態)

本実施形態は、第2、3、4の実施形態とは異なる構成の細胞固定化器にかかるものである。図9は、本実施形態の細胞固定化器19dのセンサ部16dの上面を示す図である。尚、リード線9dは、センサ部16dの下面に形成されているため、上面には現れないが、図9においては、便宜上、リード線9dを上面に示す。細胞固定化器19d

は、6行6列の格子状の各交点に電極11dが配置されている構成である。第4の実施形態の細胞固定化器19cは、センサ部16c上に一つの電極11cのみが形成されている構成であるが、本実施形態の細胞固定化器19dは、センサ部16d上に複数の電極11dとこれに対応するリード線9dが形成されている構成である。

図9は、溶液保持部を省略して示すが、溶液保持部を構成する隔壁部材（第2の実施形態の隔壁部材4と同様の構成）は、一つの電極11d毎に設置する構成、複数の電極11d毎に設置する構成いずれであってもよい。一つの電極11d毎に隔壁部材を設置する構成は、例えば各電極11d上に固定された細胞の薬品応答性を測定する際に有用であり、複数電極11d毎に隔壁部材を設置する構成は、例えば各電極11d上に固定化した神経細胞間でネットワークを形成させることができ、ネットワークに関する解析を行う際に有用である。尚、センサ部16dは、その上面にリード線9dが形成されていないので、センサ部16dと隔壁部材とは必ずしも別構成である必要はなく、一体で形成することも可能である

本実施形態においても、第2の実施形態に示した細胞の固定化方法を用いて細胞を電極11d上に固定化することが可能である。尚、本発明にかかる固定化方法は、貫通孔14dと同じく、細胞61を電極11d上に固定するのに寄与するとともに、さらに、所望の領域以外の領域に細胞61が固定化されることを防ぐ。

以下、本発明の実施例を示す。これらの実施例は、本発明を限定するものではない。

〈実施例1〉

実施例1は、第1の実施形態にかかる実施例である。基板1としてSOIウェハを、マスク層12の材料としてRN901を、固定化材料としてPEI及びコラーゲン（Sigma P-4511）を、固定化対象の細胞6として、ラット大動脈由来平滑筋細胞

VSMC s A-10 (ATCC No. CRL-1476) を用いた。

まず、4インチSOIウェハーを110℃で5分間脱水ベイクした。その後、RN901を300rpmで5秒間、3500rpmで30秒間スピンコートした。スピンコートしたウェハーを80℃で10分間プリベイクした後、直径100μmの円状パターンを露光し、現像した。現像後のウェハーを150℃で5分間ベイクした後、170℃で60分間、350℃で60分間さらにベイクした。かかるベイク工程において、沸点が略350℃以下である有害成分が除去された。

ベイク後、RN901をパターンニングしたウェハーを70%EtOHで洗浄した。そのウェハー上に、溶液保持部を形成するための隔壁部材を設置し、0.1重量%PEIを3時間コートし、その後、滅菌水で十分にリンスした。そして、細胞接着性タンパク質であるコラーゲン(Sigma P-4511)を所定の方法により37℃で30分間でウェハーにコートした。

その後、溶液保持部内を培養液で満たし、ラット大動脈由来平滑筋細胞VSMC s A-10 (ATCC No. CRL-1476) をウェハー上に播種した。培養液は、HEPES緩衝DMEM+10重量%FBSを用いた。37℃、CO₂の濃度が5重量%の雰囲気下で4日間培養した。その後、ウェハーをCO₂の濃度が5重量%の雰囲気下から出し、低CO₂濃度(CO₂の濃度0.4重量%以下)の雰囲気下で37℃を保つように放置した。4日後、ウェハーからマスク層12が剥離した。注意深く、剥離したマスク層を取り除いたところ、直径100μm内のみに細胞が固定化された円状パターンが観測された。トリパンプルー染色により、固定化されている細胞が生きていることが確認された。

次に、生きていることが確認された細胞の活動に由来する電位を、パッチクランプに

より検出した。パッチクランプは、電流を0アンペア（A）に固定した Current-Clamp モードで測定した。パッチクランプでの活動電位の測定に際して、培養液を測定液に置換した。測定液は、Caイオンと、緩衝作用を有するHEPESを有するタイロッド液を用いた。Caイオン濃度は2 mM、pHは7.4、浸透圧は273 mOsmとなるように調整した。パッチピペットに封入する内液として、塩化カリウム、EGTA、Caイオン、緩衝作用を有するHEPESを含む水溶液を調整した。内液は、HEPESを10 mMとして、pHが7.2となるように調整した。EGTAは、Caイオンをキレートする。

図10は、細胞から検出された電位変化を示す図である。横軸は時間、縦軸は電圧（すなわち細胞の活動を表す電位の強さ）を示す。図10からわかるように、細胞の静止電位は略50 mVであり、細胞は振幅略80 mV p-pの電位変化を周期的に、連続的に発生させた。一方、測定液をCaイオンを含まない測定液に置換したところ、図示は省略するが、周期的な電位変化が観測されなくなった。したがって、図10で観測される周期的な電位変化は、細胞膜に存在し、Caイオン透過性に関係する各々のイオンチャンネルが細胞内の電位に感受して開閉することによって、細胞内の電位を調整し、細胞活動を行っていることを示すものである。よって、固定化されている細胞が活性を有したままであることが確認された。

一方、比較例1-1として、ウェハー上に細胞6を固定化するまで同様の処理を行い、その後、細胞を培養した工程における雰囲気と同様の雰囲気（37℃、CO₂の濃度が5重量%）下に放置した。8日経過しても、マスク層12は剥離しなかった。

実施例1において、マスク層12が剥離したときの培養液5のpHを測定したところ、7.9であった。培養中、培養液5はCO₂の濃度が5重量%の雰囲気下にあるため、

pHは略7.4で中性に保たれていた。実施例1と比較例1-1の結果から、実施例1において、マスク層12は、培養液5が大気中に放置され、pHの値がアルカリ側に変化したことにより剥離したことがわかる。

尚、マスク材料として上記RN901に代えて、CRC8300を用いて同様の実験を行った。この場合、マスク層12は、低CO₂濃度（CO₂の濃度0.4重量%以下）の雰囲気下に放置してから7日後にウェハーから剥離した。

尚、比較例1-2として、実施例1とは、ベイク工程の条件のみ違えて実験した。比較例1-2におけるベイク工程は、現像後のウェハーを150℃で5分間ベイクした後、170℃で60分間、320℃で30分間さらにベイクした。

比較例1-2では、ウェハー上への細胞の固定化は確認されなかった。比較例1-2の結果から、比較例1-2のベイク工程では、マスク層12から細胞の有害成分が除去されなかったと推測される。

〈実施例2〉

実施例2は、第3の実施形態にかかる実施例である。

（図6に示すセンサ部の作製）

まず、4インチSiウェハー上にフォトレジストをスピコートする。6行6列の格子状の各交点に直径5μmの円形の電極11bが位置し、かつ電極11bの中心間距離が20μmであり、各電極11bから放射状に広がるリード線9bを有するパターンを複数、Siウェハーの所定の位置に露光し、現像した。そのウェハーの全面に真空蒸着法により金薄膜を堆積させた。その後、リフトオフにより、Siウェハー上に金電極のパターニングが完了した。そして、リード線9b部のみに専用現像液を要する絶縁材料であるネガティブ感光性ポリイミド樹脂UR-8300（東レ社製）で被覆した後、ダ

イシングし、40mm角の小片に切り出した。各小片は、中心に6行6列で直径5 μ mの円形の電極11bが露出し、電極11bから引き出されたリード線9bが、四方周囲に配置された配線引出し端子に連通した構成であった。このように作製した各小片を、センサ部16bとした。

(細胞の固定化)

上記のように作製したセンサ部16bの上面にCRC8300を800rpmで10秒間、4000rpmで30秒間スピコートした。スピコートしたセンサ部を110℃6分間プリベイクした後、電極11bに対応する直径5 μ mの円状パターン（6行6列）を露光し、現像した。このようにして、電極11b上面を除く領域にマスク層を形成した。現像後のウェハを150℃にて5分間ベイクした後、300℃で40分間、450℃で40分間さらにベイクした。

その後、CRC8300をパターンニングしたセンサ部16b上面を70%EtOHで洗浄した。そのセンサ部16b上面に、溶液保持部を構成する隔壁部材を当該隔壁部材内に全電極11aを含むように設置し、溶液保持部内を培養液で満たした。そして、胎生17日目のラット大脳皮質より、当業者に公知の方法を用いて調整した神経細胞を播種した。センサ部16bへの播種濃度は、 5×10^4 細胞/mLの濃度とした。播種後、温度37℃でCO₂濃度が5重量%の雰囲気下で5時間培養した後、水酸化テトラメチルアンモニウム（TMAH）溶液をpH調整剤として培養液内に注入したところ、センサ部16b上からマスク層が剥離した。注意深く、剥離したマスク層を取り除き、その後、細胞を2週間培養したところ、電極上の神経細胞間でネットワークが再構成されていることを確認した。

このとき神経細胞は、5～10個の細胞でクラスターを形成し、クラスター間でネッ

トワークが構成されていた。尚、ネットワークが再構成されていることの確認は、顕微鏡観察により行った。

再構成された神経細胞ネットワーク上の一つのクラスターの一つの細胞に $50\ \mu\text{A}$ の双極性の $100\ \mu$ 秒定電流刺激を印加し、その刺激の伝達を残り 63 個のチャンネルより測定した。その結果を図 11 に示す。図 11 は、各チャンネルで表示したコンピュータの画面のプリントアウトを示すものであり、各チャンネルにおける横軸は時間、縦軸は電圧（すなわち細胞の活動を表す電位の強さ）を示す。刺激を印加した電極はチャンネル 38 である。図 11 より、円で囲んだチャンネル、つまり 63 個中 24 個に連動した信号の伝達を観測できた。

一方、比較例 2 として、ウェハ上に細胞を固定化するまで実施例 2 と同様の処理を行い、その後、ウェハを細胞を培養した工程における雰囲気と同様の雰囲気（ 37°C 、 CO_2 の濃度が 5 重量%）下に放置する実験を行った。8 日経過しても、マスク層は剥離しなかった。

尚、絶縁層に用いた UR-8300 は、上記マスク層が剥離した条件では剥離しないものであった。また、CRC8300 は有害成分として沸点 203°C の γ ブチロラクトンを含有するものであるが、 203°C より高温でベイクを行なったことにより、かかる有害成分は気化し、除去された。したがって、かかる有害成分が、細胞に影響を与えることはなかった。

実施例 2 においてマスク層が剥離したときの培養液の pH を測定したところ、8.1 だった。培養中、培養液は CO_2 の濃度が 5 重量% の雰囲気下にあるため、pH は略 7.4 で中性に保たれていた。実施例 2 と比較例 2 の結果から、実施例 2 のマスク層は、上記のように、培養液に TMAH を注入し、培養液をアルカリ性に変化させたことにより

剥離したものであることがわかる。

上記説明から、当業者にとっては、本発明の多くの改良や他の実施形態が明らかである。従って、上記説明は、例示としてのみ解釈されるべきであり、本発明を実行する最良の態様を当業者に教示する目的で提供されたものである。本発明の精神を逸脱することなく、その構造及び／又は機能の詳細を実質的に変更できる。

クレーム

1. 細胞を基体の表面の所望領域に固定化する細胞の固定化方法であって、該方法は以下の工程を包含する：

前記基体の表面の内、前記所望領域を除く領域にマスク層を形成する工程（a）、

工程（a）の後、前記基体の表面と前記マスク層の表面に前記細胞を含む溶液を接触させ、前記細胞を固定化する工程（b）、および

工程（b）の後、前記細胞が活性を失うことなく、かつ前記マスク層が前記基体から分離するような条件に前記溶液のpHを調整する工程（c）。

2. 前記溶液は培養液である、請求項1に記載の細胞の固定化方法。

3. 工程（a）が、前記基体の表面に前記マスク層を形成する工程と、前記所望領域の前記マスク層を除去する工程を含む、請求項1に記載の細胞の固定化方法。

4. 前記マスク層は感光性を有するマスク材料で形成され、前記マスク層を除去する工程が、前記所望領域又は前記所望領域を除く領域のいずれかの前記マスク層を露光した後、現像する工程である、請求項3に記載の細胞の固定化方法。

5. 工程（c）において、前記溶液のpHを工程（b）における前記溶液のpHより大きくする、請求項4に記載の細胞の固定化方法。

6. 工程（c）において、前記pHを7.9以上8.1以下とする、請求項4に記載の細胞の固定化方法。

7. 工程（c）において、前記溶液の周囲の雰囲気中の二酸化炭素濃度を調整することにより、前記溶液のpHを調整する、請求項1に記載の細胞の固定化方法。

8. 工程（c）において、前記溶液にpH調整剤を添加することにより、前記溶液のpHを調整する、請求項1に記載の細胞の固定化方法。

9. 工程（a）の後であり、かつ、工程（b）の前に、前記マスク層を加熱する工程を有し、前記加熱は、前記マスク層中の前記細胞に対する有害な成分の沸点以上の温度にする、請求項1に記載の細胞の固定化方法。

10. 工程（b）において、前記細胞を固定化材料を介して固定化し、

前記固定化材料は、細胞接着性タンパク質、正帯電性高分子、または強塩基性官能基を有する高分子のいずれかを含む材料である、請求項1に記載の細胞の固定化方法。

要約

微小領域であったり、複雑なパターンを構成する領域であっても、高精度に、活性を保持した状態で細胞を固定化できる固定化方法を提供する。細胞を基体の表面の内、所望領域に固定化する細胞の固定化方法であって、前記基体の表面の前記所望領域を除く領域にマスク層を形成する工程（S t 2）、前記基体の表面と前記マスク層の表面に前記細胞を含む溶液を接触させ、前記細胞を固定化する工程（S t 4, S t 5）、前記細胞が活性を失うことなく、かつ前記マスク層が前記基体から分離するような条件に前記溶液のpHを調整する工程（S t 6）を包含する。